

METODE SUSPENSİ SEL UNTUK MEMBENTUK SPOT HIJAU PADA
KULTUR *IN-VITRO* GALUR MUTAN TANAMAN
JARAK PAGAR (*Jatropha curcas* L.)
(Ita Dwimahyani)

ISSN 1907-0322

METODE SUSPENSİ SEL UNTUK MEMBENTUK SPOT HIJAU PADA KULTUR *IN-VITRO* GALUR MUTAN TANAMAN JARAK PAGAR (*Jatropha curcas* L.)

Ita Dwimahyani

Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi – BATAN, Jakarta

ABSTRAK

METODE SUSPENSİ SEL UNTUK MEMBENTUK SPOT HIJAU PADA KULTUR *IN-VITRO* GALUR MUTAN TANAMAN JARAK PAGAR (*Jatropha curcas* L.). Jarak pagar sangat berpotensi sebagai energi alternatif (*biofuel*), karena mampu menghasilkan minyak nabati yang dapat diolah menjadi bahan bakar pengganti energi fosil. Peningkatan permintaan akan biodiesel mendorong ketersediaan bibit tanaman jarak pagar yang berkualitas. Untuk memenuhi hal tersebut pembibitan tanaman jarak pagar dalam skala besar sangat dibutuhkan. Metode perbanyakan dengan suspensi sel diharapkan dapat menghasilkan bibit tanaman jarak pagar yang benar-benar homogen. Telah dilakukan pengujian laboratorium untuk menguji keefektifan metoda sel suspensi dengan eksplan kotiledon galur mutan jarak pagar (JH-38) yang mempunyai keunggulan pada tinggi tanaman, umur genjah dan berbuah terus menerus. Dua jenis media pertumbuhan untuk induksi kalus yaitu media A (MS + 2,4-D 2,0 mg/l + BAP 0,5 mg/l + ekstrak *malt* 0,1 g + agar 8,0 g/l) dan B (MS + 2,4-D 3,0 mg/l + BAP 0,5 mg/l + ekstrak *malt* 0,1 g + agar 8 g/l). Untuk media regenerasi digunakan media cair dengan komposisi media induksi tetapi tanpa agar. Untuk media regenerasi setelah proses sel suspensi digunakan media padat ECS (*Embryogenic Cell Suspension*) dengan komposisi MS + glutamin 0.5 g + casein hidrolisat 0,5 g + IAA 0,5 mg/l + BAP 3 mg/l + agar 8,0 g/l. Hasil percobaan menunjukkan bahwa pertumbuhan diameter kalus optimum diperoleh eksplan JH-38/3 yang diinduksikan dengan media A. Tingkat pertumbuhan sel embriogenik berkisar dari 0 sampai 130 %. Persentase pembentukan spot hijau optimum diperoleh dari eksplan JH-38/1 yang diinduksi dengan media A.

Kata kunci : Jarak pagar (*Jatropha curcas* L.), Galur mutan, Kultur *in-vitro*, Suspensi sel.

ABSTRACT

CELL SUSPENSION METHOD TO IMPROVE GREENSPOT IN IN-VITRO CULTURE OF JARAK PAGAR (*Jatropha curcas* L.) MUTANT LINES. *Jatropha curcas* has a high potential as an alternative energy source, since it can produce natural oil which could be processed into fuel replacing fossil energy. Increasing demand of biodiesel has resulted in increasing demand for high quality of *jatropha* germplasm. Cell suspension method is expected to assure the production of a homogeneous germplasm of *jatropha*. A laboratory experiment was conducted to evaluate the effectiveness cell suspension method in of *Jatropha curcas* cotyledon. The explant used in this experiment was *Jatropha curcas* seed mutant line (JH-38) which has superiority in plant height, early maturity and unseasonal fruiting. Two kinds of in-vitro medium were used for callus induction, i.e. medium A (MS + 2,4-D 2.0 mg/l + BAP 0.5 mg/l + malt extract 0.1 g + agar 8.0 g/l) and medium B (MS + 2,4-D 3.0 mg/l + BAP 0.5 mg/l + malt extract 0.1 g + agar 8.0 g/l). The same medium composition without agar was used for cell generating, and medium ECS (MS + glutamine 0.5 g + casein hydrolysisate 0.5 g + IAA 0.5 mg/l + BAP 3.0 mg/l + agar 8.0 g/l for cell growth. Results of the experiment showed that the optimum growth of calli was obtained by explant JH-38/3 in medium A. The growth level of embryonic cell ranged from 0 to 130 %. The optimum percentage greenspot is shown by JH-38/1 explant in medium A.

Key words : *Jatropha curcas*, mutant line, *in-vitro* culture, cell suspension

PENDAHULUAN

Jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) merupakan tanaman semak famili Euphorbiaceae yang memiliki banyak manfaat, salah satunya adalah sebagai penghasil minyak jarak yang dapat digunakan sebagai bahan bakar. Program pengembangan tanaman Jarak pagar dengan teknik mutasi untuk mendapatkan varietas unggul, telah menghasilkan galur-galur mutan harapan antara lain berumur genjah dan berbuah terus menerus (1). Galur mutan ini akan segera memasuki tahap pengujian lapangan atau uji adaptasi di lahan-lahan yang telah diproyeksikan sebagai daerah pengembangan bahan bakar nabati biodiesel (2), sehingga diperlukan ketersediaan bibit dalam jumlah yang besar dalam waktu yang tidak terlalu lama. Kultur jaringan merupakan salah satu solusi alternatif untuk mengatasi permasalahan tersebut. Selain dapat menghasilkan tanaman dalam jumlah besar dalam waktu relatif singkat dengan sifat morfologi dan fisiologi yang sama dengan tanaman induknya (3). Akan tetapi dari hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya yaitu dengan menggunakan kultur pucuk dan kultur embrio baik pada galur mutan krisan maupun pada galur mutan pisang hasil yang didapat belum optimal, karena masih terjadi keragaman genetik yang cukup tinggi. Tampak pada tanaman yang diperoleh dari hasil kultur *in-vitro* dengan eksplan kapitulium galur mutan krisan, masih menunjukkan keragaman pada warna dan bentuk bunga. Demikian juga pada hasil perbanyakan galur mutan tanaman pisang (4). Karena keberhasilan teknik kultur jaringan dipengaruhi oleh banyak faktor yaitu: genotip bahan tanaman yang dikulturkan, substrat yaitu media dan zat pengatur tumbuh, lingkungan yaitu kondisi fisik tempat kultur ditumbuhkan dan fisiologi jaringan tanaman yang digunakan sebagai eksplan (5). Semua faktor ini diduga merupakan penyebab masih terjadinya keragaman genetik yang tinggi.

Salah satu teknik yang diharapkan dapat mengatasi terjadinya keragaman genetik adalah suspensi sel. Dengan metode suspensi sel diharapkan dapat menghasilkan bibit tanaman jarak pagar yang benar-benar homogen. Secara garis besar proses dalam suspensi sel diawali dengan menginokulasikan eksplan berupa bagian tanaman yang terdiferensiasi dalam media cair misalnya fragmen dari *hypocotyl* atau kotiledon. Selanjutnya sel-sel yang telah terbagi tersebut secara berangsur-angsur akan memisahkan diri dari inokulum karena pengadukan atau goyangan pada media cair.

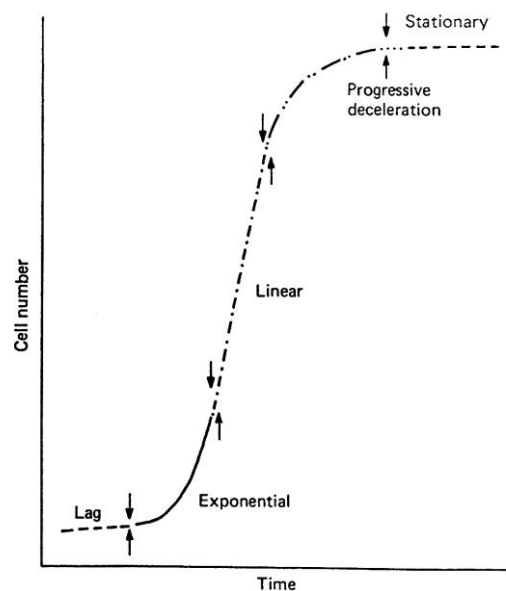
Ketika eksplan atau bagian dari tanaman dimasukkan pertama kali ke dalam media cair terdapat sebuah periode awal utama (*lag period*) yaitu periode yang menunjukkan sinyal dari pembelahan sel. Kemudian diikuti oleh peningkatan jumlah sel secara eksponensial dan

peningkatan populasi sel secara linier, selanjutnya akan terjadi perlambatan secara berangsur-angsur pada tingkat pembelahan. Diakhiri dengan masuknya sel-sel pada fase *stationary* atau tidak lagi terjadi pembelahan. Hubungan pertumbuhan suspensi sel dan fase pertumbuhan dapat dilihat pada grafik pertumbuhan suspensi sel yang menghubungkan jumlah total sel per unit volume terhadap waktu, yang dibiakan dalam kondisi *batch*, seperti yang diperlihatkan dalam Gambar 1. Untuk mempertahankan kelangsungan hidup dari kultur eksplan, sebaiknya sel-sel tersebut di subkultur pada awal fase *stationary* (6).

Metode Suspensi sel (*cell suspension*) melalui beberapa tahapan dari Induksi kalus (*Callus Induction*), Inisiasi suspensi sel (*Initiation of Cell Suspension*), Pemeliharaan Suspensi sel (*Maintenance of Cell Suspension*) dan Regenerasi Tanaman (*Plant Regeneration*) (7):

Induksi Kalus (Callus Induction)

Pada tahap ini dilakukan proses induksi kalus untuk mendapat kalus, yang akan digunakan sebagai material dasar melakukan suspensi sel. Pada proses induksi kalus, eksplan diinduksikan ke media padat kemudian diinkubasi pada suhu 27°C dalam ruang gelap (7) selama kurang lebih 6 minggu (8). Kemudian dilakukan penyeleksian terhadap kalus yang terbentuk, diambil kalus yang bersifat *friable* (remah atau mudah rontok) dan berwarna putih (9). Kalus yang bersifat *friable embryogenic* tersebut disebut kalus ideal (*Ideal Callus*) atau IC (7). Kalus ideal bersifat *friable* dan mudah rontok atau gugur ke dalam media cair.

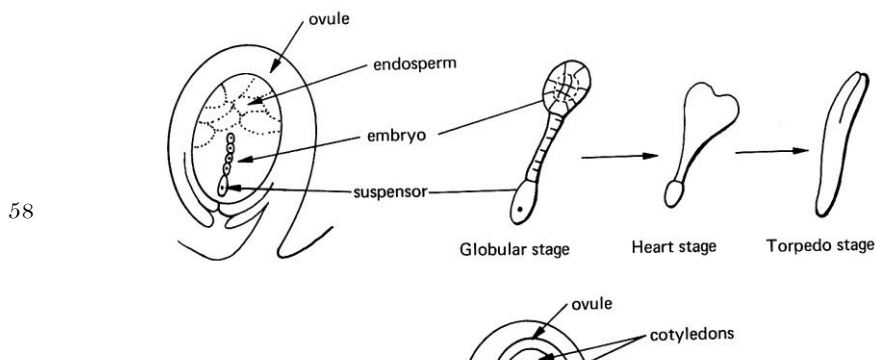


Gambar 1. Grafik Pertumbuhan Suspensi Sel yang menghubungkan antara jumlah total sel per unit volume terhadap waktu, yang dibiakan dalam kondisi *batch* (5)

Tahap ini merupakan tahap yang sangat penting karena tingkat kesuksesan dari proses inisiasi *embryogenic cell suspension* (ECS) atau suspensi sel yang baik, bergantung pada kualitas dan volume dari kalus ideal, yang ditentukan dari keberadaan embrio yang hanya sedikit. Kemampuan pembungaan pada tanaman untuk menghasilkan embrio tidak terbatas pada perkembangan dari telur yang dibuahi, tetapi embrio juga dapat digunakan untuk membentuk jaringan tanaman pada kultur jaringan (7). Hal tersebut merupakan suatu fenomena pada tanaman tingkat tinggi, dan penelitian *somatic embryogenesis* terhadap lebih dari 30 famili tanaman yang telah dilakukan pada bidang kultur jaringan (10). Pada umumnya, *embryogenesis* muncul pada kultur yang bersifat jangka pendek dan kemampuan tersebut menurun seiring dengan meningkatnya durasi atau waktu kultur (11).

Menurut Kohlenbach (12), *embryosomatic* dapat ditumbuhkan secara *in vitro* dari sumber sel-sel diploid yang dikulturkan, yaitu sel-sel vegetatif dari tanaman dewasa, jaringan reproduksi lain selain zigot, dan *hypocotyl* dan kotiledon dari embrio serta planlet muda yang tidak ditumbuhkan dari kalus.

Menurut Sharp dkk (13), *embryosomatic* dapat diinisiasikan dalam dua cara yang berbeda. Pada beberapa kultur, embriogenik muncul secara langsung tanpa adanya produksi kalus dari "*preembryonic termained cell*" yang diprogram untuk diferensiasi embrio. Tipe yang kedua dari perkembangan yang meliputi beberapa *callus proliferation* awal, dan embrio terbentuk dari "*induced embryogenic cell*" dengan kalus. Pembentukan sel pada embrio dicirikan oleh meningkatnya kandungan *cytoplasmic*, membesarnya butir-butir pati, dan pada umumnya terjadi pembesaran *nucleus* dengan *nucleolus* bernoda hitam. Reagen-reagen yang bernoda mengindikasikan bahwa sel-sel embriogenik tersebut memiliki konsentrasi protein dan RNA yang tinggi (6). Setiap pertumbuhan embrio melewati fase-fase yaitu fase *globular*, *heart shape*, dan *torpedo shape*. (Gambar 2).



Gambar 2. Fase pertumbuhan embrio pada tumbuhan dikotil (14)

Pada media dengan kandungan auksin tinggi dapat terjadi embryosomatic yang tidak normal, setelah embriogenik sel terdiffernsiasi. Peristiwa tersebut dikenal dengan istilah “*Embryonal Budding*” dan “*Embryogenic Clump Formation*” (12). Untuk mengatasi keabnormalan yang terjadi dapat dilakukan dengan menggunakan dua tipe media yang berbeda yaitu, media untuk inisiasi embriogenik sel dan media untuk perkembangan lanjutan sel menjadi embrio.

Media induksi pertama harus mengandung auksin sedangkan media kedua mengandung campuran sedikit auksin, dengan konsentrasi yang sama, dari jenis auksin yang sama atau dengan mengurangi konsentrasi dari jenis auksin yang berbeda. Untuk beberapa jenis tanaman baik inisiasi embrio maupun perkembangan lanjutannya terjadi pada media pertama sedangkan perkembangan plantlet terjadi pada media kedua (15).

Faktor kimia terpenting pada media induksi adalah auksin dan pengurangan nitrogen. Oleh karena itu, pengurangan jumlah nitrogen secara substansial sangat diperlukan pada ke dua tipe media tersebut. Penambahan karbon aktif pada media juga dapat membantu pembentukan embriogenik pada beberapa jenis kultur, hal ini dikarenakan karbon aktif dapat menyerap berbagai jenis substansi inhibitor sebaik *growth promoters* (15). Selain itu, pembentukan embriogenik mencapai 90% lebih ditunjukkan oleh kelompok-kelompok sel yang dikultur pada media bebas auksin yang mengandung zeatin (16).

Inisiasi Sel suspensi (Initiation of Cell Suspension)

Pada tahap ini IC yang telah terbentuk ditransfer atau diinduksikan ke dalam erlenmeyer yang berisi media cair (7). Sebelum diinokulasikan kalus tersebut dipotong-potong dengan skapel menjadi beberapa bagian, dan sebaiknya digunakan kalus muda yang masih aktif tumbuh, sebagai inokulum (15).

Erlenmeyer yang telah berisi inokulum kemudian diinkubasikan pada *shaker* dengan kecepatan 100 – 120 rpm untuk Erlenmeyer 250 ml (17) pada ruang gelap dengan suhu 25 – 27 ° C. Masa inkubasi dari inokulum tergantung dari materi eksplan atau jenis tanaman. Apabila setelah beberapa hari media berubah warna menjadi putih susu, hal ini merupakan pertanda adanya kontaminasi selama proses inokulasi (6).

Pemeliharaan Cell suspension (Maintenance of Cell Suspension)

Selama masa inkubasi perlu dilakukan subkultur terhadap suspensi sel, hal ini bertujuan untuk meningkatkan kualitas dari suspensi sehingga dapat dihasilkan ECS yang bersifat homogen (7). Untuk melakukan subkultur dan memelihara kultur sangat penting sebelumnya untuk menentukan kepadatan sel, karena subkultur harus dilakukan tepat pada saat kepadatan sel mencapai tahap maksimum. Untuk kebanyakan kultur suspensi sel kepadatan sel maksimum tercapai kurang lebih pada 18 – 25 hari, walaupun begitu *passage time* untuk beberapa kultur yang sangat aktif bisa jauh lebih pendek yaitu sekitar 6 – 9 hari (6). Menurut Street (18), umumnya suspensi sel mengandung $0.5 - 2.5 \times 10^5$ sel per ml media, setelah penambahan dengan media cair. Subkultur selanjutnya dilakukan setiap 7 – 10 hari, tergantung pada tingkat perkembangan dari ECS, dengan cara mengganti media kultur dengan media baru atau segar dengan tetap menyisakan media kultur yang lama sebanyak 10 – 20 %. Kemudian memindahkan *yellowish meristematic globules*, *withish embryos* pada fase *cotyledonary*, jaringan *necrotic* dan *highly vacuolated cell* yang terdapat pada media lama ke media baru (7).

Untuk menentukan pertumbuhan dari sel dapat dilakukan dengan menggunakan takaran PCV (*Packed Cell Volume*), yang dilakukan dalam kondisi steril, pada hari kultur ke 0, 3, 5, 7, 9, 11, 13, dan 15. Adapun metodenya adalah sebagai berikut : suspensi sel dalam Erlenmeyer dikocok secara halus kemudian 10 ml media kultur dipipet, kemudian dibagi ke dalam tabung-tabung sentrifus berbentuk kerucut, selanjutnya diputar pada 200 g selama 5 menit menggunakan *swing – out rotor* (9).

Perlu diperhatikan juga bahwa kualitas ECS akan menurun dengan semakin banyaknya subkultur, hal ini kemungkinan dikarenakan kontaminasi dan penurunan tingkat pertumbuhan serta kapasitas regenerasi sel (19), sedangkan ECS yang berkualitas memiliki sifat mudah beregenerasi menjadi *embryosomatic* dan tumbuh menjadi tanaman (7).

Regenerasi Tanaman (Plant Regeneration)

Setelah ECS berkembang menjadi *embryosomatic*, ECS harus dipindahkan untuk dikecambahkan. Pada Tahap ini ECS yang telah berkembang menjadi *embryosomatic* ditransfer ke media padat untuk kemudian dikecambahkan menjadi planlet. Tahapan pertumbuhannya meliputi perkembangan embrio, kemudian perkecambahan embrio, dan selanjutnya pertumbuhan planlet.

Perkembangan Tanaman (Plant Development)

Pada tahap ini terjadi pertumbuhan planlet menjadi tanaman lengkap, kemudian dilakukan aklimatisasi terhadap planlet dan selanjutnya planlet akan tumbuh menjadi tanaman sempurna.

Tujuan percobaan ini adalah mempelajari metode suspensi sel untuk tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) guna mendapatkan kalus dan spot hijau sebagai materi dasar untuk pembentukan planlet.

BAHAN DAN METODE

Persiapan material eksplan jarak

Eksplan tanaman yang digunakan adalah biji galur mutan jarak pagar (JH-38/1, JH-38/2, JH-38/3, JH-38/4 dan JH-38/5) hasil dari program penelitian pemuliaan mutasi tanaman Jarak pagar di PATIR - BATAN dengan keunggulan sifat tanaman pendek, berumur genjah dan berbuah terus menerus. Disertakan juga kontrol (J-1) yaitu biji yang diperoleh dari tanaman induk yang tidak diradiasi. Biji jarak dipisahkan antara tempurung yang berwarna hitam dengan bungkil biji, dengan cara memukul biji jarak. Masing-masing biji dimasukkan ke dalam erlenmeyer atau botol kultur yang berisi larutan *Clorox* 40% \pm 26 – 30 ml dan larutan *tween* 20 sebanyak 3 – 4 tetes, lalu dikocok selama kurang lebih 20 menit. Selanjutnya dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 – 4 kali.

Persiapan media induksi

Media yang digunakan untuk induksi adalah media MS (Murashige and Skoog) yang telah dimodifikasi, yang terdiri atas dua jenis yaitu: media A {(MS + 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 2 mg/l + BAP (6-benzilaminopurin) 0,5 mg/l + malt ekstrak 0,1 g +

agar 8 gr/l)} dan B {(MS + 2,4-D 3 mg/l + BAP 0,5 mg/l + malt ekstrak 0,1 g + agar 8 gr/l). Untuk media cair digunakan media yang komposisinya sama dengan media induksi hanya tidak ditambahkan agar (pemadat). Untuk media regenerasi setelah proses sel suspensi, digunakan media padat ECS (*Embryogenic Cell Suspension*) dengan komposisi MS + glutamin 0.5 g + casein hidrolisat 0,5 g + IAA (Indole acetic acid) 0,5 mg/l + BAP 3 mg/l + agar 8 gr/l.

Induksi kalus

Biji galur mutan yang digunakan kemudian disterilisasi, Eksplan biji yang telah steril dipotong (dibelah) dengan pinset steril menjadi dua bagian dan diambil bagian kotiledonnya kemudian ditanam dalam cawan petri berisi media induksi: A dan B. Selanjutnya diinkubasi dalam ruang gelap dengan suhu 26 ° C selama 4 minggu untuk pertumbuhan kalus. Penggunaan kotiledon dikarenakan kotiledon merupakan salah satu sumber embriosomatik (12) dan pilihan terbaik untuk induksi pembelahan sel (6).

Pengamatan pertumbuhan kalus

Parameter pengamatan kalus meliputi : diameter kalus, warna kualitatif kalus dan friabilitas kalus. Diameter kalus diamati dan diukur pada minggu pertama dan minggu kedua setelah induksi eksplan. Pengamatan warna dan friabilitas kalus dilakukan secara visual. Kalus yang terbentuk menjadi materi dasar untuk penelitian selanjutnya.

Inisiasi dan pemeliharaan dari suspensi sel

Kalus yang terbentuk pada tahap induksi kalus diseleksi secara visual untuk mendapatkan kalus yang bersifat ideal atau embriogenik (ECS) ECS yang telah didapatkan kemudian diregenerasikan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi media cair sebanyak 50 ml, dengan menggunakan pinset steril. Media cair yang digunakan merupakan media dengan komposisi yang sama dengan media induksi hanya saja tidak diberi pemadat. Erlenmeyer kemudian ditutup dengan menggunakan *aluminium foil*. Erlenmeyer yang telah berisi ECS kemudian diinkubasikan dalam *thermoshaker* yang telah diatur pada kecepatan 50 rpm selama 5 minggu. Selama masa inkubasi, dilakukan subkultur terhadap media cair dengan cara menggantinya dengan media yang baru. Proses subkultur dilakukan setelah terdapat serpihan kalus pada media cair. Subkultur dilakukan untuk mengganti media dengan cara memipet dan membuangnya dalam keadaan steril di dalam *laminar air flow*. Media lama disisakan sebanyak 10 - 20 % sehingga serpihan kalus tidak ikut terbuang. Erlenmeyer yang berisi ECS diletakan

dengan kemiringan 45°, selanjutnya media baru dipipet ke dalam Erlenmeyer sebanyak 50 ml. Erlenmeyer kemudian ditutup dengan *aluminium foil*. Setelah dilakukan subkultur, erlenmeyer diletakan kembali dalam *thermoshaker* dengan kecepatan 50 rpm. Subkultur dilakukan sebanyak 2 – 3 kali sampai serpihan kalus semakin membesar dan membentuk globular-globular. Subkultur selanjutnya diperlakukan dengan cara yang sama akan tetapi sisa 10-20% media lama yang berisi serpihan kalus, dipipet beserta isinya dengan menggunakan pipet ukur steril yang ujungnya rata. Setelah seluruh globular kalus mengendap di dasar pipet, diambil dengan cara meletakkannya secara vertikal untuk mengambil endapan kalus dan dimasukkan ke dalam botol steril yang berisi 50 ml media segar.

Pengamatan pada tahap ini adalah pengukuran terhadap volume ECS (*Embryogenic Cell Suspension*) dengan menggunakan metode PCV (*Packed Cell Volume*) yaitu besar volume suspensi sel yang embriogenik yang terbentuk dihitung dari jumlah endapan ECS yang tetampung pada mulut pipet dan dihitung dalam satuan ml.

Regenerasi planlet

Pengamatan pada tahap ini dilakukan terhadap pertumbuhan spot hijau, yang dilakukan secara visual dengan alat bantu kaca pembesar. Setelah ECS berbentuk globular (gumpalan besar) dan mulai menyatu, ECS harus segera diregenerasikan ke media padat. Untuk meregenerasikan ke media padat ECS harus dipisahkan dari media cair dengan cara filtrasi menggunakan saringan *stainless steel* steril berukuran 7 cm, yang sebelumnya telah direndam dengan alkohol 96% dan dibakar di atas pembakar bunsen. Setelah dipisahkan dari media cair, ECS yang terdapat pada saringan dipindahkan ke dalam cawan petri steril dengan cara mengetukan ujung saringan pada tepi cawan petri, sehingga ECS akan jatuh ke dalam cawan petri, setelah itu cawan petri tersebut langsung ditutup. ECS selanjutnya diinduksikan ke dalam cawan petri yang berisi media regenerasi. ECS diambil dari cawan petri dengan menggunakan skapel steril kemudian dioleskan secara merata pada permukaan media regenerasi. Masing-masing erlenmeyer dibuat menjadi 4 ulangan. Media yang telah berisi ECS selanjutnya diinkubasikan pada suhu 26°C, sampai terbentuk spot hijau.

Perhitungan persentase spot hijau dilakukan dengan cara : setiap ulangan yang membentuk spot hijau, dari 4 ulangan yang dibuat dihitung sebesar 25%, sehingga apabila keempat ulangan yang dibuat mampu membentuk spot hijau secara keseluruhan maka persentase pertumbuhan spot hijaunya 100%. Pengamatan terhadap pertumbuhan spot hijau dilakukan secara visual dengan menggunakan alat bantu kaca pembesar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Galur mutan tanaman jarak pagar yang digunakan pada percobaan ini adalah galur mutan JH-38 yang merupakan galur mutan unggulan hasil percobaan sebelumnya. Sifat unggul yang dimiliki oleh galur mutan tersebut diharapkan dapat diwariskan kepada turunannya. Perbanyakan dengan kultur jaringan dianggap sebagai cara yang terbaik, karena salah satu manfaat dari teknik kultur jaringan adalah mendapatkan tanaman baru dalam jumlah banyak dalam waktu relatif singkat, mempunyai sifat fisiologi dan morfologi yang sama atau serupa dengan tanaman induknya, serta memperoleh tanaman baru yang unggul (21).

Namun, dari percobaan yang telah dilakukan sebelumnya walaupun diperbanyak dengan metode kultur jaringan, keragaman genetik yang terjadi masih tinggi, terutama pada varietas hasil mutasi. Metode suspensi sel diharapkan dapat menghasilkan tanaman jarak pagar yang bersifat homogen, karena planlet yang dihasilkan dengan menggunakan metode suspensi sel bersifat embrio somatik, yang berasal dari sel tunggal sehingga perkembangan selanjutnya sama dengan embrio zigotik (22).

Media MS (20) merupakan media yang umum digunakan untuk mengkulturkan berbagai macam tanaman. Karena belum ada media kultur sel suspensi yang sesuai untuk jarak pagar maka dilakukan modifikasi media MS terhadap komposisi media dan zat pengatur tumbuhnya. Kedua media yaitu media A dan media B digunakan sebagai media induksi. Media cair untuk suspensi sel menggunakan media yang sama dengan media induksi hanya saja tidak diberi pematid, sedangkan media yang digunakan untuk regenerasi ECS adalah media ECS.

Penggunaan komposisi zat pengatur tumbuh yang berbeda pada kedua jenis media induksi dan media cair untuk suspensi sel dilakukan untuk melihat pengaruhnya pada pertumbuhan kalus, sehingga bisa dihasilkan kalus yang bersifat *Ideal Callus* (IC), yang merupakan materi dasar dalam metode suspensi sel. Hormon auksin dan hormon sitokinin pada media berperan penting terhadap pertumbuhan jaringan yang dikultur dan bagaimana jaringan itu akan tumbuh (23). Interaksi antara hormon auksin (2,4-D) dan hormon sitokinin (BAP) dengan komposisi *intermediate* sitokinin dan rendah auksin akan menghasilkan pembentukan kalus yang terus menerus (24)

Komposisi zat pengatur tumbuh pada media regenerasi ECS yaitu sitokinin (BAP) tinggi dan auksin (IAA) rendah diharapkan akan memacu pertumbuhan pucuk atau tunas saja (25), karena pada tahap ini diharapkan akan terbentuk spot hijau.

Tahapan metode suspensi sel yang digunakan pada penelitian ini merupakan modifikasi dari beberapa metode suspensi sel, disesuaikan dengan sumber eksplan. Secara garis besar proses dalam suspensi sel diawali dengan menginokulasikan media cair dengan eksplan berupa bagian tanaman yang terdiferensiasi misalnya fragmen dari *hypocotyl* atau kotiledon. Selanjutnya sel-sel yang telah terbagi tersebut secara berangsur-angsur akan memisahkan diri dari inokulum karena pengadukan atau goyangan pada media cair (6).

Pengamatan pada tahap induksi kalus meliputi, diameter kalus, warna kualitatif kalus, dan friabilitas kalus. Pembentukan kalus ini terlihat pada kedua jenis media, baik pada media A maupun media B. Eksplan berupa kotiledon biji jarak yang telah diinduksikan pada dua jenis media, mulai membentuk kalus pada minggu kedua setelah induksi. Pengamatan secara visual pada kalus memperlihatkan bahwa pada permukaan kalus terbentuk kelompok sel meristematik yang berasal dari sel parenkim kotiledon. Kelompok sel meristematik tersebut berpotensi menjadi sel-sel embriogenik.

Pengukuran diameter kalus dilakukan pada minggu pertama dan minggu kedua setelah kalus terbentuk. Pertumbuhan diameter kalus tercepat pada media A adalah pada eksplan JH-38/3 yaitu 1,40 cm/7 hari, sedangkan diameter kalus terpanjang pada media A adalah pada eksplan JH-38/4 yaitu 3,20 cm. Pertumbuhan diameter kalus tercepat pada media B adalah pada eksplan JH-38/1 yaitu 1,10 cm/7 hari, sedangkan diameter kalus terpanjang pada media B adalah pada eksplan JH-38/5 yaitu 3,10 cm. (Tabel 1.)

Tabel 1. Pertumbuhan Diameter Kalus (cm) pada Dua Jenis Media

Perlakuan		Diameter kalus (cm)		Laju Pertumbuhan kalus (cm)/7 hari
		Minggu		
Eksplan	Media	II	III	
Kontrol	A	2,75	3,15	0,40
	B	2,00	2,50	0,50
JH-38/1	A	1,75	2,60	0,85
	B	1,70	2,80	1,10
JH-38/2	A	1,90	2,85	0,95
	B	2,30	3,00	0,70
JH-38/3	A	0,80	2,20	1,40
	B	2,60	3,00	0,40
JH-38/4	A	3,00	3,20	0,20
	B	0,95	1,40	0,45
JH-38/5	A	2,50	2,60	0,10
	B	2,80	3,10	0,35

Media A yang memiliki komposisi : media MS ditambah dengan malt ekstrak 0,1 g dan zat pengatur tumbuh 2,4-D 2 mg/l serta BAP 0,5 mg/l memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan media B yang memiliki komposisi : media MS ditambahkan malt ekstrak 0,1 g, dan zat pengatur tumbuh 2,4-D 3 mg/l serta BAP 0.5 mg/l. Kalus yang terbentuk pada media A pada umumnya memiliki pertumbuhan yang lebih besar dibandingkan dengan pertumbuhan kalus pada media B, selain itu diameter kalusnya secara keseluruhan pun lebih panjang.

Pengamatan terhadap warna kualitatif kalus dilakukan secara visual. Warna kalus pada media A pada minggu pertama didominasi oleh warna putih, hanya pada eksplan JH-38/3 terdapat warna kuning. Akan tetapi pada minggu kedua terdapat eksplan yang berubah warna menjadi kuning, yaitu JH-38/1 dan JH-38/2. Warna kalus di media B pada minggu pertama terlihat semua eksplan berwarna putih. Akan tetapi pada minggu kedua seperti pada media A warna kalus pada beberapa eksplan berubah menjadi kuning yaitu pada eksplan JH-38/2, dan JH-38/5 (Tabel 2).

Tabel 2. Warna Kualitatif Kalus pada Dua Jenis Media

Perlakuan		Minggu	
Eksplan	Media	II	III
Kontrol	A	Putih	Putih
	B	Putih	Kuning
JH-38/1	A	Putih	Kuning
	B	Putih	Putih
JH-38/2	A	Putih	Kuning
	B	Putih	Kuning
JH-38/3	A	Kuning	Kuning
	B	Putih	Putih
JH-38/4	A	Putih	Putih
	B	Putih	Putih
JH-38/5	A	Putih	Putih
	B	Putih	Kuning

Pengamatan terhadap friabilitas kalus juga dilakukan secara visual. Pengamatan terhadap warna kualitatif kalus dan friabilitas kalus sangat penting dilakukan karena kalus yang dapat digunakan sebagai materi dasar pada suspensi sel haruslah kalus yang bersifat IC. Semakin tinggi friabilitas sel, akan semakin memudahkan sel untuk melakukan separasi secara sempurna. Semua kalus yang dihasilkan pada tahap induksi kalus memiliki sifat yang *friable* (remah atau mudah rontok atau gugur), sehingga merupakan IC dan dapat digunakan sebagai materi dasar

untuk sel suspensi. Selain itu, untuk mendapatkan kalus perlu dilakukan interaksi antara hormon auksin dan hormon sitokinin sedang pada media induksi, dengan komposisi auksin rendah dan sitokinin (24). Perubahan warna dan perbedaan friabilitas yang terjadi diduga faktor keragaman genetik akibat mutasi, sebab mutasi direfleksikan dalam munculnya keragaman genetik tanaman, sehingga walaupun eksplan yang digunakan dari satu galur dan diberi perlakuan yang sama, namun dapat memberikan hasil dengan karakteristik yang berbeda. Kemungkinan lain disebabkan antara hormon auksin dan sitokinin pada media induksi belum diperoleh komposisi yang sesuai untuk eksplan tersebut. Komposisi media B dengan konsentrasi hormon auksin (3 mg/l) memberikan hasil yang lebih baik dari pada media A (2 mg/l). Kesesuaian terhadap media juga tidak luput dari pengaruh genetik eksplan sehingga perlu dikembangkan lebih lanjut pada media, dengan variasi auksin serta sitokinin yang sesuai untuk eksplan jarak pagar.



Gambar 3. Kalus yang terbentuk pada umur 19 hari

Penambahan malt ekstrak pada kedua jenis media dimaksudkan untuk memberikan suplemen pada eksplan yang diharapkan dapat

memacu pertumbuhan kalus, hal ini dikarenakan malt ekstrak merupakan senyawa suplemen organik (6). Eksplan yang telah diinduksikan ke dalam cawan petri yang berisi media induksi kemudian direkatkan dengan parafilm, dan dibungkus dengan aluminium.

Pembungkusan aluminium pada cawan petri dimaksudkan untuk memberikan simulasi ruang gelap, karena untuk proses inisiasi dan perkembangan *subsequent* kalus sebaiknya eksplan diinkubasikan dalam ruang gelap (27). Suhu yang digunakan untuk proses inkubasi adalah 26°C. Belum diketahui secara pasti berapa suhu optimum untuk pembentukan kalus pada eksplan kotiledon biji jarak, sehingga digunakan rentang antara 25 – 27 °C. Karakteristik pertumbuhan

kalus melibatkan hubungan yang kompleks antara material tanaman yang digunakan untuk menginisiasikan kalus, komposisi media, dan kondisi lingkungan selama masa inkubasi (28). Sehubungan dengan teori tersebut, berdasarkan hasil penelitian ini, komposisi media yang optimum untuk mendapatkan kalus dari eksplan kotiledon biji jarak adalah MS + 0,1 malt ekstrak + 2 mg/l 2,4-D + 0,5 BAP, dan diinkubasikan pada suhu 26°C.

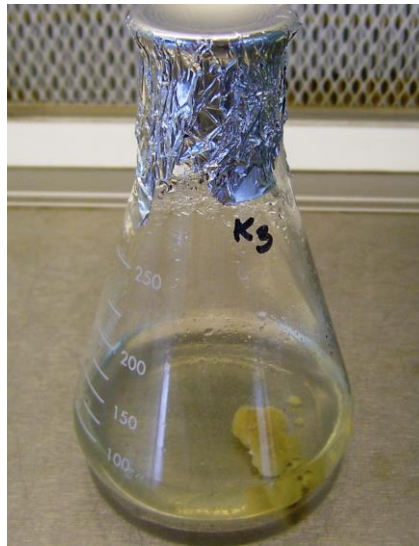
Hasil seleksi kalus baik pada media A maupun media B menunjukkan semua eksplan menghasilkan IC. Untuk menghasilkan suspensi sel yang baik adalah penting untuk menginisiasikan kultur suspensi dari kalus yang ideal bersifat *friable*. Kalus kemudian diinisiasikan kedalam erlenmeyer berukuran 250 ml yang telah berisi media cair sebanyak 50 ml (9) dengan menggunakan pinset steril.

Setelah kalus diinisiasikan pada media cair erlenmeyer ditutup dengan *aluminium foil*, dan diinkubasikan diperlakukan dengan cara seperti yang dijelaskan dalam bahan dan metode. Masa inkubasi dari inokulum tergantung dari media dan materi eksplan yang digunakan atau jenis tanaman.

Media cair yang digunakan pada proses inisiasi ini merupakan media yang sama dengan media yang digunakan sebagai media induksi, hanya saja tidak diberi pematat (agar), karena fungsi yang diinginkan pun sama dengan media induksi, yaitu untuk merangsang pertumbuhan kalus. Hanya saja pada tahap ini kalus diharapkan akan terbentuk dalam keadaan *single cell* atau sel tunggal. Untuk itu, dilakukan pengadukan atau penggoyangan dengan menggunakan *shaker*.

Pengadukan atau penggoyangan membuat sel-sel akan memisahkan diri dan terbaurkan dalam media cair, dan membentuk suspensi sel (9). *Shaker* yang digunakan pada penelitian ini adalah *thermoshaker*, yaitu *shaker* yang dilengkapi dengan indikator suhu. Selain untuk membantu membuat sel-sel memisahkan diri, pengadukan juga berfungsi sebagai aerasi pada kultur suspensi sel (6). Aerasi sangat penting dalam kultur suspensi sel karena inokulum terendam dalam media cair, sehingga tanpa aerasi yang baik maka dapat mengakibatkan kematian pada inokulum.

Kecepatan yang optimum untuk kultur suspensi sel dalam erlenmeyer ukuran 250 ml adalah 100 – 120 rpm (17). Oleh karena keterbatasan kemampuan alat yang digunakan, pada percobaan ini kecepatan yang digunakan adalah 50 rpm. Apabila setelah beberapa hari media berubah warna menjadi putih susu, hal ini merupakan pertanda adanya kontaminasi selama proses inokulasi (5).



Gambar 4. Kalus yang telah diinisiasikan ke dalam media cair

Mekanisme pembentukan sel tunggal atau ECS atau sel embriogenik adalah dimulai dari kalus yang telah diinisiasikan dalam media cair yang tumbuh dan terus membelah, pada permukaan kalus akan terdapat kelompok sel meristemematik yang berpotensi sebagai sel embriogenik. Penggoyangan atau pengadukan membuat kelompok sel tersebut akan memecah atau memisahkan diri dan akan membaur dalam media cair membentuk sel tunggal atau ECS. Setelah itu sel akan terus membesar dan membentuk gumpalan atau *globular*.

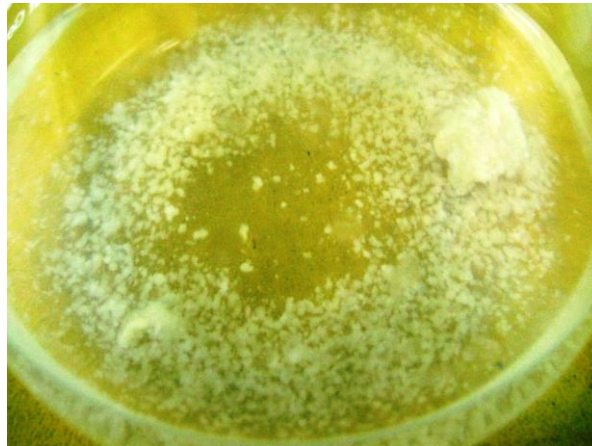
Selama masa inkubasi perlu dilakukan subkultur terhadap suspensi sel, hal ini bertujuan untuk meningkatkan kualitas dari suspensi sehingga dapat dihasilkan ECS yang bersifat homogen (7). Untuk melakukan subkultur dan memelihara kultur sangat penting sebelumnya untuk menentukan kepadatan sel, karena subkultur harus dilakukan tepat pada saat kepadatan sel mencapai tahap maksimum. Untuk kebanyakan kultur suspensi sel kepadatan sel maksimum tercapai kurang lebih pada 18 – 25 hari, walaupun begitu *passage time* untuk beberapa kultur yang sangat aktif bisa jauh lebih pendek yaitu sekitar 6 – 9 hari (6). Subkultur pada penelitian ini dilakukan dua kali yang pertama dilakukan 3 minggu setelah proses inisiasi, pada saat sel tunggal mulai terbaurkan dalam media cair dan yang kedua dilakukan 2 minggu setelah dilakukan sub kultur yang pertama.

Untuk mempertahankan kelangsungan hidup dari kultur, sebaiknya sel-sel tersebut di subkultur pada awal fase *stationary* (6). Subkultur dilakukan di dalam *laminar*. Ketika melakukan

sub kultur diusahakan agar serpihan pada media cair tidak ikut terbang, karena serpihan kuning tersebut merupakan sel tunggal. Sub kultur pada penelitian ini hanya dilakukan sebanyak 2 kali, dikarenakan kualitas ECS akan menurun dengan semakin banyaknya sub kultur. Hal ini disebabkan terjadinya kontaminasi dan penurunan tingkat pertumbuhan serta kapasitas regenerasi sel (19).

Ketika kalus ditempatkan pada media cair, IC akan mudah pecah dan terdispersi menjadi *clumps* (gumpalan) dengan ukuran 0,5 – 5,0 mm. Agitasi lanjutan akan membuat *clumps* yang telah terbentuk terpecah kembali menjadi *small cell aggregate* (9). Setelah dilakukan sub kultur pertama, dari pengamatan yang dilakukan secara visual terjadi peningkatan terhadap jumlah serpihan dalam media cair. Serpihan yang terbentuk berwarna kuning, dan berbentuk bulat. Serpihan tersebut kemudian menggumpal membentuk gumpalan kecil (*small aggregate*), dan semakin lama gumpalan kecil tersebut semakin membesar membentuk gumpalan besar (*globular aggregate*).

Setelah dilakukan subkultur kedua, gumpalan besar tersebut semakin membesar dan berbentuk seperti hati (*heart stage*). Seperti yang disampaikan oleh Jhon dan Roberts (6), bahwa setiap pertumbuhan embrio akan melewati beberapa fase yaitu, *globular*, *heart shape*, dan *torpedo shape*.



Gambar 5. Suspensi sel berupa globular-globular

Biomasa dari kultur suspensi sel akan meningkat sejalan dengan pembelahan dan pembesaran sel selama masa inkubasi, hal ini akan berlanjut selama beberapa periode sampai pertumbuhan akan terhenti akibat penurunan pada beberapa faktor atau akumulasi dari metabolit yang bersifat racun pada media (9).

Pengamatan pada tahap inisiasi dan pemeliharaan dilakukan dengan mengukur volume ECS menggunakan metode PCV. Pertambahan volume ECS terbesar pada media A adalah pada eksplan JH-38/2, dan JH-38/4 yaitu 0,50 ml. Sedangkan volume ECS terbesar pada media A adalah pada eksplan JH-38/1, JH-38/2, dan JH-38/4 yaitu 1,00 ml. Pertambahan volume ECS terbesar pada media B adalah pada eksplan JH-38/4 yaitu 1,30. Sedangkan volume ECS terbesar pada media B adalah pada eksplan JH-38/4 yaitu 1,50. (Tabel 3).

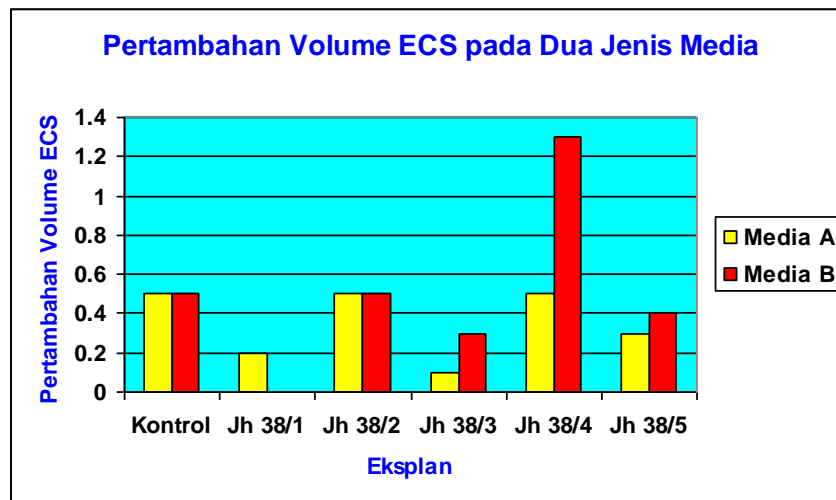
Tabel 3. Pertambahan Volume *Embryogenic Cell Suspension* (ml) pada Dua Jenis Media

Perlakuan		Volume (ml)		Pertambahan Volume (ml)
		Minggu		
Eksplan	Media	III	V	
Kontrol	A	0,50	1,00	0,50
	B	0,50	1,00	0,50
JH-38/1	A	0,80	1,00	0,20
	B	0,10	0,10	0,00
JH-38/2	A	0,50	1,00	0,50
	B	0,50	1,00	0,50
JH-38/3	A	0,10	0,20	0,10
	B	0,50	0,80	0,30
Jh-38/4	A	0,50	1,00	0,50
	B	0,20	1,50	1,30
JH-38/5	A	0,20	0,50	0,30
	B	0,60	1,00	0,40

Berdasarkan hasil perhitungan volume ECS, dapat diketahui tingkat pertumbuhan ECS berkisar antara 0 – 130 %, Tingkat pertumbuhan ECS terendah yaitu 0 % kemungkinan dikarenakan pengukuran yang dilakukan menggunakan pipet ukur dengan ukuran 5, 10, dan 25 ml, sehingga penambahan yang terlalu kecil tidak terukur. Sedangkan tingkat pertumbuhan tertinggi yaitu 130 % dimungkinkan karena eksplan mampu menyerap nutrisi yang ada secara optimum, dibandingkan eksplan lain. Hal ini diduga karena faktor mutasi pada galur mutan, sehingga memiliki kemampuan menyerap nutrisi secara optimal (Gambar 6).

ECS yang telah berbentuk hati harus segera dipindahkan ke media regenerasi, sebab jika tidak langsung dipindahkan akan menyebabkan kematian pada sel. Hal ini disebabkan bila, sel tumbuh dalam media yang sama untuk waktu yang lama akan terjadi penurunan nutrisi pokok yang dibutuhkan dan membuat *gradual desiccation of gelling agent* (6).

ECS selanjutnya diinduksikan ke dalam cawan petri yang berisi media regenerasi. Pengambilan ECS dari cawan petri dilakukan dengan menggunakan skapel steril kemudian dioleskan secara merata pada permukaan media regenerasi seperti mengoles selai pada roti. Hal ini dimaksudkan agar ECS tidak mati dan rusak akibat tertekan atau pecah. Skapel yang digunakan juga tidak boleh terlalu panas, karena akan membuat ECS mati.



Gambar 6. Pertambahan volume ECS pada dua jenis media

Media yang telah berisi ECS kemudian diinkubasikan pada ruang kultur dengan suhu 26°C, sampai terbentuk spot hijau. Tahapan pertumbuhan ECS setelah diregenerasikan meliputi perkembangan embrio, kemudian perkecambahan embrio, dan selanjutnya pertumbuhan *in vitro* planlet. Keberhasilan percobaan ini ditentukan oleh terbentuk atau tidaknya spot hijau pada eksplan.

Penambahan *glutamine* pada media regenerasi ECS dimaksudkan sebagai sumber nitrogen untuk pembentukan protein, karena *glutamine* adalah sumber spesifik donor nitrogen dalam beberapa proses sintesis yang penting. *Glutamine* digunakan pada proses sintesis

glucosaamine dan derivatnya, yang merupakan monomer dari *chitins* yaitu komponen dalam pembuatan dinding sel pada serangga, fungi, dan beberapa tanaman tingkat tinggi (14).

Penambahan *casein hidrolisat* pada media juga dimaksudkan sebagai sumber nitrogen. *Casein* merupakan protein susu yang berasal dari sapi, yang mengandung campuran yang terdiri dari setidaknya 18 asam amino yang berbeda (29). Sumber nitrogen menjadi penting karena merupakan materi dasar untuk proses sintesis protein, dan banyak sintesis protein memiliki peranan dalam meristematik atau perkembangan jaringan (14).

Spot hijau pada eksplan tidak terbentuk dalam waktu yang bersamaan. Umumnya spot hijau terbentuk pada umur 1 minggu setelah induksi. Namun ada pula eksplan yang baru terbentuk spot hijaunya pada umur 3 minggu setelah induksi. Pembentukan spot hijau yang tidak bersamaan diduga karena adanya keragaman genetik yang dihasilkan akibat peroses mutasi, dapat dilihat dari ECS yang sama akan tetapi memiliki waktu yang berbeda dalam pembentukan spot hijau.

Pada tahap regenerasi tanaman dilakukan pengamatan secara visual terhadap pertumbuhan spot hijau. Semakin tinggi persentase pembentukan spot hijau maka keberhasilan percobaan pun semakin tinggi. Persentase pembentukan spot hijau tertinggi pada media A adalah pada eksplan JH-38/1 yaitu 100%, sedangkan pada media B persentase pembentukan spot hijau tertinggi adalah pada eksplan JH-38/3 dan JH-38/5 yaitu 100%. Hasil 0% pada eksplan JH-38/2 yang diinduksikan pada media B dimungkinkan karena ECS yang terbentuk tidak dapat beregenerasi akibat sudah tua atau dimungkinkan karena media regenerasi belum cocok untuk eksplan, sehingga eksplan tidak mampu membentuk spot hijau (Tabel 4)

Tabel 4. Persentase Pembentukan Spot Hijau pada Dua Jenis Media

Perlakuan		Persentase Pertumbuhan Spot Hijau
Eksplan	Media	
Kontrol	A	62,5%
	B	100%
JH-38/1	A	100%
	B	25%
JH-38/2	A	75%
	B	0%
JH-38/3	A	50%
	B	100%
JH-38/4	A	62,5%
	B	50%
JH-38/5	A	62,5%
	B	100%

Berdasarkan hasil pengamatan pada pembentukan spot hijau semua kalus mampu membentuk spot hijau baik dari kalus yang berwarna putih maupun yang berwarna kuning. Kemungkinan pengamatan pada penentuan warna kalus kurang tepat yaitu antara putih susu dengan krem, karena batasannya sangat relatif. Seperti contoh pada gambar 7. warna antara kalus ideal dan kalus yang tidak embryogenik sulit untuk dipastikan antara putih dan putih kekuningan. Kemungkinan pada pengamatan warna kalus (Tabel 2), baik yang berwarna kuning maupun putih sama sama bersifat embriogenik sehingga mampu membentuk spot hijau. Pengamatan secara visual pada eksplan yang diinduksikan pada media A, spot hijau yang terbentuk sangat hijau dan tajam yang hampir menutup semua permukaan kalus, spot hijau yang paling baik adalah eksplan JH-38/3, terlihat dari warna hijau yang sangat tua dan tajam, akan tetapi secara kualitatif yang terbaik adalah eksplan JH-38/1, karena persentase pembentukan spot hijaunya tertinggi yaitu mencapai 100%.(Gambar 8.). Pada media B spot hijau yang terbentuk secara visual pada semua galur mutan hampir sama, berwarna hijau muda mendekati pudar walaupun secara kualitatif menunjukkan persentase pembentukan spot hijau mencapai 100% pada beberapa galur mutan seperti pada JH 38/3, JH 38/5 dan kontrol. Warna spot hijau yang tua dan tajam menunjukkan kualitas spot hijau yang ideal dan akan mempengaruhi terbentuknya pucuk hingga pembentukan planlet tanaman.

Callus

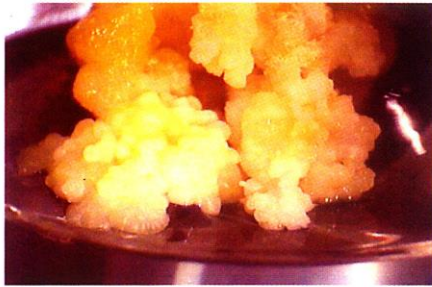


Figure 14. Non-embryogenic yellow nodular callus.



Figure 15. Compact (non-embryogenic) callus.



Figure 16. Individual embryos.



Figure 17. Embryos and compact callus.

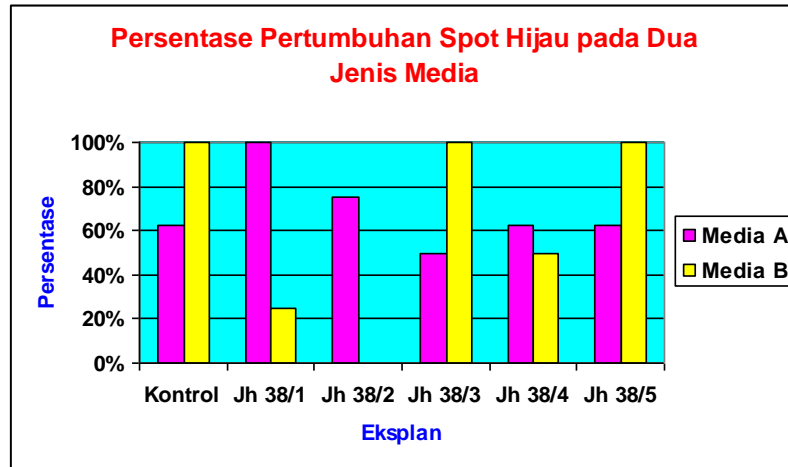


Figure 18. Ideal callus.



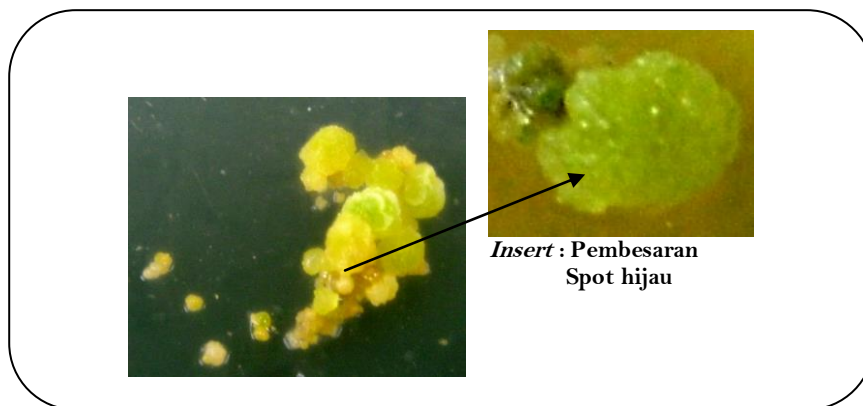
Figure 19. Ideal callus with translucent proembryos.

Gambar 7. Kalus ideal dan kalus non ideal



Gambar 8. Persentase pembentukan spot hijau pada dua jenis media

Sedangkan pada media B dianggap tidak sesuai untuk proses suspensi sel pada eksplan kotiledon biji galur mutan tanaman jarak pagar, dikarenakan pada pembentukan spot hijau, walaupun mencapai persentase 100 % akan tetapi kualitas dari spot hijau yang terbentuk kurang baik ditunjukkan dengan warna hijau yang sangat muda dan mendekati pudar sehingga sulit untuk berkembang menjadi planlet. Kekurangsempurnaan pada pembentukan spot hijau kemungkinan disebabkan oleh konsentrasi hormon dan komposisi media yang tidak cocok dengan eksplan.



Gambar 9. Spot hijau yang terbentuk pada media ECS

KESIMPULAN

Dari percobaan ini dapat disimpulkan bahwa metode sel suspensi pada galur mutan tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) telah berhasil membentuk spot hijau dan persentase

pembentukan spot hijau yang optimum adalah pada media A yang ditunjukkan oleh pertumbuhan eksplan galur mutan JH-38/1. Pertumbuhan diameter optimum kalus juga ditunjukkan pada media A yang dihasilkan dari eksplan JH-38/3. Sedangkan tingkat pertumbuhan ECS pada percobaan ini berkisar antara 0 – 130 %. Dari hasil percobaan ini ditunjukkan bahwa perbanyakan dengan metode suspensi sel dapat dilakukan untuk memperoleh bibit jarak dalam jumlah besar dalam waktu relatif singkat dan jumlah yang besar.

DAFTAR PUSTAKA

1. DWIMAHYANI, I, 2007. Pemuliaan Mutasi Tanaman Jarak Pagar. Seminar Nasional Implementasi Pengembangan Industri Biodisel Di Indonesia. Jogjakarta.
2. Bahan Bakar Nabati, Bahan Bakar Tumbuhan sebagai Pengganti Minyak Bumi dan Gas. Tim Nasional Pengembangan BBN. 2007
3. GUNAWAN, L.W. 1992. Teknik Kultur Jaringan. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. Pusat Antar Universitas – IPB. Bogor. Hal 87.
4. ITA DWIMAHYANI dkk, 2004. Laporan Teknis Perbaikan Genetik Tanaman Hortikultura dengan Biomutasi., PATIR-BATAN.
5. GEORGE, E.F DAN P.D. SHERRINGTON. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Exegation Limited. London. Hal 167.
6. JHON, H. D., DAN L. W. ROBERTS. 1995. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press. Amerika Serikat.
7. STROSSE, H., R. DOMERGUE, B. PANIS, JEAN-VINCENT ESCELANT, DAN F. CÔTE. 2003. Banana and Plantain Embryogenic Cell Suspensions. In INIBAP Technical Guidelines 8.
8. LEE, TAN-JIN, R. W., SHULTZ, L., HANLEY-BOWDOIN, DAN W. F., THOMPSON. 2004. Establishment of Rapidly Proliferating Rice Cell Suspension Culture and Its Characterization by Fluorescence-Activated Cell Sorting Analysis. [Http:// pubs.nrc-cnrc.gc.ca/ispmb/ispmb 22/ro4-050.pdf](http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/ispmb/ispmb%204-050.pdf). Diakses pada tanggal 15 April 2006.
9. GÜREL, S., E. GÜREL, DAN Z. KAYA. 2001. Establishment of Cell Suspension Cultures and Plant Regeneration in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). pdf. Diakses pada tanggal 16 April 2006.
10. RAGHAVAN, V. 1976. Experimental Embryogenesis in Vascular Plants. Academic Press. New York.

11. REINERT , J., D., Y. P. S., BAJAJ, DAN B. ZBELL. 1977. Aspect Organization : Organogenesis, Embryogenesis, Cytodifferentiation. In Plant and Tissue Culture, 2d Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
12. KOHLENBACH, H. W. 1978 Comparative Somatic Embryogenesis. In Frontiers of Plant Tissue Culture 1978, ed. T. A. Thorpe, pp. 59 – 66. IAPTC. Calgary.
13. SHARP, W. R., M. R., SONDHAL, L. S. CALDAS, DAN S. B. MARAFFA. 1980. The Physiology of In Vitro Asexual Embryogenesis. Hort. Rev. 2. Hal 268 – 310.
14. BIDWELL, R. G. S. 1979. Plant Physiology, 2d Ed. Macmilan Publishing CO., INC. New York.
15. AMMIRATO, P. V. 1983. Embryogenesis. Handbook of Plant Cell Culture, vol. 1, Technique for Propagation and Breeding, ed. Macmillan. New York.
16. FUJIMURA, T., DAN A., KOMAMINE. 1979. Synchronization of Somatic Embryogenesis in a Carrot Cell Suspension Culture. Plant Physiol. 64, 162 – 4.
17. THOMAS, E DAN M R. DAVEY 1975. From Single cell to Plants. Wykeham London.
18. STREET, H. E. 1977. Cell (Suspension) Cultures – Techniques. In Plant Tissue and Cell Culture, 2d Ed., ed. H. E. Street, pp. Blackwell Scientific Publications. Oxford. Hal 61 – 102.
19. GEORGET, R., R. DOMERQUE, N. FERRIÈRE, DAN F. X., CÔTE. 2000. Morpho-histological Study of Different Constituents of Banana (*Musa* AAA, cv. Grande naine) Embryogenic Cell Suspension. Plant Cell Report 19:748-754.
20. MURASHIGE, T. AND F.A SKOOG. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay With Tobacco Tissue Cultures. Physiol Plant..
21. SRIYANTI, D. P., DAN A. WIJAYANI. 1994. Teknik Kultur Jaringan Tanaman. Kanisius. Yogyakarta.
22. PHILLIP, G.C., HUBSTENBERGER, J.F AND HANSEN, E.E, 1995. Plant Regeneration by organogenesis from callus and cell suspension cultures, In Gamborg O.L, Phillips, G.C (eds) Plant Cell, Tissue and Organ Culture, pp. 66-78. Heiderberg: Springer and Verlag.
23. YUSNITA. 2003. Kultur Jaringan: Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien. Agromedia Pustaka. Tangerang.
24. ABIDIN, Z. 1983. Dasar-dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh. Angkasa. Bandung.
25. HENDARYONO, D. P. S., DAN ARI W. 1994. Teknik Kultur Jaringan : Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakkan Tanaman Secara Vegetatif Moderen. Kanisius. Yogyakarta.

26. STAFFORD, A. 1996. Natural Products and Metabolites from Plants and Tissue Culture. Jhon Wiley and Sons. Chichester.
27. DIXON, R. A. 1985. Isolation and Maintenance of Callus and Cell Suspension Culture. IRL Press. Oxford.
28. AITCHISON, P. A., A. J., MACLEOD, DAN M. M., YEOMAN. 1977. Growth Patterns in Tissue (*Callus*) Cultures. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
29. KLEIN, R. M., DAN D. T., KLEIN. 1970. Research Methods Plant Science. Natural History Press. Garden City, New York.